

Aus der medizinischen Universitätspoliklinik Zürich
(Direktor: Prof. R. HEGGLIN)

Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. W. SIEGENTHALER

Zur Isolierung von 18-Aldosteronglucuronid und Tetrahydroaldosteronglucuronid aus menschlichem Urin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der medizinischen Fakultät

der Universität Zürich

vorgelegt von

Jan Möhring

von Frankfurt/Main

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. W. SIEGENTHALER

Zürich 1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026



Zur Isolierung von 18-Aldosteronglucuronid und Tetrahydroaldosteronglucuronid aus menschlichem Urin*

J. MÖHRING

Medizinische Universitäts-Poliklinik Zürich (Direktor: Prof. R. HEGGLIN)

1950 wiesen DEMING und LUETSCHER [1] als erste einen natriumretinierenden Faktor im Urin Ödemkranker nach. Dieser Faktor wurde dann papierchromatographisch isoliert und als Aldosteron identifiziert [2—5]. Durch 24stündige Inkubation bei pH 1 oder mit Beta-Glucuronidase bei pH 4,8 konnten VENNING [6], LUETSCHER [7] und AXELRAD [8] die extrahierbare Menge von freiem Aldosteron erheblich vermehren. Die Natur der auf diese Weise hydrolysierten Aldosteronkonjugate blieb zunächst unbekannt.

1961 identifizierten ULICK u. Mitarb. [9] den ersten Aldosteronmetaboliten in menschlichem Urin als das 3 α ,5 β -Tetrahydroaldosteron. Es liegt im Urin als Glucuronid vor und wird durch Beta-Glucuronidase quantitativ gespalten [10]. 1963 hat es PASQUALINI [16] als ein 3-Monoglucuronid aufgeklärt.

* Diese Arbeit wurde durch die Hilfe des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und der Stiftung für wissenschaftliche Forschung an der Universität Zürich ermöglicht.

1962 identifizierten KELLY u. Mitarb. [11] eine Reihe weiterer Metaboliten. Zur Zeit sind etwa 60% der Aldosteronmetaboliten bekannt, von welchen 10% auf den pH 1-Metaboliten und 35% auf das Tetrahydroaldosteronglucuronid fallen [12].

Die Natur des pH 1-Metaboliten blieb lange Zeit unbekannt und ist bis heute noch nicht endgültig aufgeklärt. AYRES u. Mitarb. [13] vermuteten zunächst ein „3-oxo-Sulfat“ oder ein „18-Glucuronid“. Die Gruppe von TAIT u. Mitarb. [14, 15] teilte 1963 und 1964 eine Methode zur Isolierung dieses Metaboliten aus menschlichem Urin mit und konnte ihn mit großer Wahrscheinlichkeit als das 18-Aldosteronglucuronid charakterisieren.

Da wir uns für Fragen des Stoffwechsels von Aldosteron und die biologische Bedeutung seiner Metaboliten interessierten, versuchten wir, das Tetrahydroaldosteronglucuronid (THA-Gluc.) und das 18-Aldosteronglucuronid (18-Gluc.) nach den in der

Literatur angegebenen Methoden [14—16, 26] aus menschlichem Urin zu isolieren. Diese Methoden gehen unserer Erfahrung nach nur mit geringen Ausbeuten von etwa 5—10% einher, worauf die betreffenden Autoren selbst schon hingewiesen haben.

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Kombination verschiedener Methoden, so Extraktion nach EDWARDS u. Mitarb. [17], Säulenchromatographie nach BARLOW [18] und Papierchromatographie nach UNDERWOOD und TAIT [15], womit wir für das 18-Gluc. Ausbeuten um knapp 50% und für das THA-Gluc. Ausbeuten um 80% erzielen konnten.

Reagentien

d-Aldosteron (Organon)
d-Aldosteron-1,2-³H, spez. Aktivität 32,2 bzw. 35 c/mMol, radiochemische Reinheit 98% (New England Nuclear Corp., Boston)
Ammoniumsulfat p.a. (E. Merck)
Citronensäure p.a., Mol.-Gewicht 210,15 (Analar)
di-Natriumphosphat nach SÖRENSEN, Mol.-Gewicht 177,99 (E. Merck)
konzentrierte Essigsäure (ca. 96% ig) p.a. (E. Merck)
Diäthyläther puriss. p.a. (Fluka)
96%iger Alkohol
Benzol kristallisierbar p.a. (E. Merck); gereinigt über Kieselgel 0,05—0,20 mm für die Chromatographie (E. Merck)
n-Butylalkohol für die Chromatographie (E. Merck)
Essigsäureäthylester p.a. (E. Merck)
Aluminiumoxyd Woelm neutral, Aktivitätsstufe 1
Chromatographiepapier Whatman Nr. 1 (Schleicher u. Schüll)
Ketodase Warner-Chilcott, 5000 E Beta-Glucuronidase/ml nach FISHMAN

Methode

Eine Mischung bekannter Mengen von d-Aldosteron und ³H-Aldosteron wurde Patienten, die deutliche Zeichen einer Leberinsuffizienz (Lebercirrhose) zeigten, in kaltem Tee zu trinken gegeben. Anschließend sammelten wir die beiden ersten 6 Std-Urine und den folgenden 12 Std-Urin. Die Urinportionen wurden in folgender Weise aufgearbeitet:

Extraktion [17, 19]. Ein Urinaliquot, das ungefähr 500 γ 18-Gluc. und THA-Gluc. enthielt — das sind etwa 50% der gesamten Radioaktivität im Urin (s. Tabelle 2) —, wurde mit Aqua dest. auf ein Volumen von 200 ml gebracht, mit konz. Essigsäure auf pH 5 eingestellt, mit 100 g Ammoniumsulfat versetzt (ca. 73% Sättigung) und dann 3—5mal mit $\frac{1}{2}$ Volumen Äther-Äthanol 3:1 v/v extrahiert. Die Äther-Äthanol-Phasen wurden zusammen am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft und in 3 ml 96%igem Alkohol aufgenommen.

Säulenchromatographie [18, 20]. Eine Säule mit einem inneren Durchmesser von 2 cm wurde mit 20 g Al₂O₃, suspendiert in gereinigtem Benzol, hepakt. Nach Einsickern der in Alkohol gelösten Substanzen wurde mit folgenden Lösungsmitteln eluiert: 200 ml Benzol-Äthanol 1:1, 100 ml Äthanol und 200 ml 0,04 molarem Na₂HPO₄-Citronensäurepuffer pH 6.

Die letzte 200 ml-Fraktion wurde auf pH 5 eingestellt und wie oben extrahiert und eingedampft.

Papierchromatographie [15]. Der zur Trockne eingedampfte Rückstand wurde in 2 ml 50%igem Alkohol gelöst. Aliquots von etwa 200 γ Glucuroniden pro Papier (57 cm : 20 cm) wurden in den von UNDERWOOD und TAIT angegebenen System I (n-Butanol-Essigsäureäthylester-Wasser-Essigsäure 50-450-425-75) 6 $\frac{1}{2}$ Std lang und im System II (n-Butanol-Essigsäureäthylester-Wasser-Essigsäure 450-50-425-75) 14 Std lang absteigend chromatographiert.

Die beiden Zonen von 18-Gluc. und THA-Gluc. wurden anhand ihrer Radioaktivität mit einem Gasdurchflußstreifen-zähler, „Strip-counter“ (Actigraph II, Nuclear Chicago), lokalisiert und getrennt mit 50%igem Alkohol eluiert. In der Regel mußten wir die Chromatographie in beiden Systemen wiederholen, bis die Eluate sauber waren.

Diskussion der einzelnen Schritte

Vor der **Extraktion** stellten EDWARDS u. Mitarb. [17] den Urin auf pH 2,5 ein. FLOOD u. Mitarb. [19] gaben für das 18-Gluc. unterschiedliche Löslichkeitskoeffizienten bei pH 5 und pH 2 an, und zwar 0,25 (Konzentration im Lösungsmittel gegen Konzentration in der wäßrigen Phase) bei pH 5 und 1,8 bei pH 2. Wir konnten diesen Unterschied nicht finden: Nach dreimaliger Extraktion waren in der Regel 90—95% vom 18-Gluc. bei pH 2 und pH 5 im Lösungsmittel, bei einem durchschnittlichen Löslichkeitskoeffizienten von 1,5. Für THA-Gluc. fanden wir auch keine signifikanten Unterschiede bei den verschiedenen pH. Der durchschnittliche Löslichkeitskoeffizient betrug 0,9, und mit dreimaligem Extrahieren wurden etwa 70% des THA-Gluc. erfaßt. Deshalb extrahierten wir meistens ein viertes und fünftes Mal. Die beiden letzten Extrakte wurden gesondert eingedampft und chromatographiert.

BARLOW [18] führte die **Säulenchromatographie** an Al₂O₃ durch, um im Urin vorhandene Steroidsulfate von Steroidglucuroniden quantitativ zu trennen. Er eluierte mit Äthanol, dann mit 50%igem Äthanol und zuletzt mit dem beschriebenen Phosphat-Citronensäurepuffer. Er fand dabei in den ersten beiden Fraktionen nur Steroidsulfate und keine Glucuronide, welche erst mit dem Puffer quantitativ eluiert wurden. AYRES u. Mitarb. [20] bestätigten diese Verhältnisse. Sie eluierten außerdem zu Beginn noch mit 50%igem Benzol-Äthanol v/v und fanden in dieser Fraktion nur reine Steroide. Wir fanden in den Urinen unserer Patienten, welche in der Regel 50 mg d-Aldosteron erhalten hatten, ähnliche Verhältnisse vor, welche in Tabelle 1 dargestellt sind. Daraus geht hervor, daß THA-Gluc. und 18-Gluc. zu einem Teil bereits mit

Tabelle 1. Säulenchromatographie an Al₂O₃ mit Referenzsubstanzen (nach AYRES u. Mitarb. [20])

	Cortisol-1,2- ³ H (20 γ)	Aldosteron- 1,2- ³ H (20 γ)	Tetrahydro- aldosteron- 1,2- ³ H (15 γ)	18-Aldosteron- glucuronid- 1,2- ³ H (10 γ)	Tetrahydro- aldosteron- glucuronid-1,2- ³ H (10 γ)
200 ml Benzol:Äthanol 1:1	8,4%	63,4%	2,8%	0,6%	0,6%
100 ml Äthanol	3,8%	0,9%	0,6%	0,1%	0,2%
150 ml Äthanol:Wasser 1:1	74,3%	31,3%	70,3%	15%	3,5%
200 ml 0,04molarer Phosphat- Citronensäurepuffer, pH 6	11,3%	3,8%	10,9%	81%	95,3%
Anteil an Ausgangsmenge (insgesamt)	97,8%	99,4%	84,6%	96,7%	99,6%

Die Prozentzahlen sind das Mittel von jeweils 3 Säulenchromatographien und drücken den Anteil der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen von der verwendeten Gesamtradioaktivität aus.

Tabelle 2. Beispiel einer Bestimmung des Metabolitenverhältnisses im Urin eines Patienten mit ausgesprochener Leberinsuffizienz (Lebercirrhose) nach Gabe von ^3H -Aldosteron und d-Aldosteron. Aus den einzelnen Urinportionen wurde 18-Aldosteronglucuronid und Tetrahydroaldosteronglucuronid isoliert

Sammeldauer in Std nach Injektion von 52,1 Mio. cpm ³ H-Aldosteron	Ausgeschie- dene totale cpm mit An- gabe der % der injizierten Menge	Totale cpm von				Aus den Urinportionen isolierte cpm von	
		freiem Aldo- steron	freiem Tetrahydro- aldosteron	18-Aldosteron- glucuronid	Tetrahydro- aldosteron- glucuronid	18-Aldosteron- glucuronid (Prozent- anteil an totalen cpm 18-Aldosteron- glucuronid = Ausbeute)	Tetrahydro- aldosteron- glucuronid (Prozentanteil an totalen cpm Tetrahydro- aldosteron- glucuronid = Ausbeute)
		(mit Prozent der totalen Urin-cpm)					
0—6	23,45 Mio. =45 %	102300 cpm =0,44 %	431145 cpm =1,84 %	6662700 cpm =28,4 %	5519200 cpm =23,5 %	3290400 cpm =49,4 %	4475300 cpm =81 %
6—12	13,27 Mio. =25,5 %	39400 cpm =0,3 %	162300 cpm =1,2 %	2673900 cpm =20,1 %	3920500 cpm =29,6 %	1310550 cpm =49 %	3228580 cpm =82 %
12—24	5,49 Mio. =10,5 %	13450 cpm =0,24 %	64160 cpm =1,2 %	684400 cpm =12,5 %	1756000 cpm =32 %	326100 cpm =47,6 %	1272680 cpm =72,5 %
Auf den 24 Std-Urin umgerechnet	42,21 Mio. =81 %	155200 cpm =0,4 %	637600 cpm =1,6 %	10021000 cpm =23,7 %	11195800 cpm =26,5 %	durchschnitt- liche Ausbeute =49 %	durchschnitt- liche Ausbeute ≈80 %

Äthanol-Wasser eluiert werden. Bei Patienten mit ausgesprochener Leberinsuffizienz kommt es sogar vor, daß die beiden Glucuronide zur Hauptsache mit dieser Phase eluiert werden.

Wir folgten dem unter „Methode“ angegebenen Weg, um vor allem Urinpigmente abzutrennen, die in größeren Mengen auf der Säule blieben. Die mittlere Laufzeit der Säulenchromatogramme betrug 3 Std. Das pH der letzten Fraktion lag bei pH 8,5—9, weshalb wir bereits während des Eluierens mit dem Puffer tropfenweise konzentrierte Essigsäure dazugaben, um eine Alkalizersetzung der beiden Glucuronide zu vermeiden.

Auf den Papierchromatogrammen wurde das 18-Gluc. und das THA-Gluc. mit dem Strip-counter lokalisiert. Nach Abtrennung des Schmutzes fanden wir für das 18-Gluc. im System I einen R_f -Wert von 0,3 und im System II von 0,5 und für das THA-Gluc. im System I einen R_f -Wert von 0,5 und im System II von 0,68. Auf Höhe dieser R_f -Werte waren die Tetrazoniumblaureaktion [21] und Naphthoresorcinreaktion [22] positiv. Die R_f -Werte für freies Aldosteron wie für freies THA lagen in beiden Systemen bei 0,88, die R_f -Werte für die freie Glucuronsäure lagen bei 0,3 im System I und bei 0,55 im System II.

Die Reinheit der isolierten Substanzen

Zur Prüfung der Reinheit von 18-Gluc. und THA-Gluc. gingen wir im wesentlichen nach den von UNDERWOOD und TAIT [15] angegebenen Kriterien vor.

Die radiochemische Reinheit war für uns gegeben, wenn folgende vier Bedingungen erfüllt waren:

1. Zweimal identische R_f -Werte in den Chromatographiesystemen I und II;
2. mit den R_f -Werten von 18-Gluc. identische UV-Adsorptionszonen bei 254 m μ und fehlende UV-Adsorption auf Höhe des THA-Gluc. [11];
3. positive Tetrazoniumblaureaktion auf Höhe beider Glucuronide und
4. einzige radioaktive Zone im Strip-counter.

Die chemische Identität mit 18-Gluc. und THA-Gluc. galt uns als genügend gesichert, wenn die weiteren fünf Kriterien erfüllt waren:

5. Positive Naphthoresorcinreaktion [22];
6. negative Sulfatreaktion [23] und negative Phosphatreaktion [24];
7. negative Tetrazoniumblaureaktion und Porter-Silber-Reaktion in einem Methylenchloridextrakt am Ende der Isolierung;
8. weniger als 0,5 % der Radioaktivität mit Methylenchlorid extrahierbar (im Mittel sind 0,3 % der Radioaktivität mit gleichem Volumen Methylenchlorid extrahierbar) und
9. folgende Befunde nach zweimal 24stündiger pH 1-Hydrolyse bzw. Ketodase-Inkubation der gleichen Proben:

Nach 24stündiger pH 1-Hydrolyse des 18-Gluc. ließ sich immer über 90 % der Radioaktivität extrahieren (im Mittel 93 %), welche sich nach Chromatographie im System Benzol-Methanol-Wasser (100-50-25) nach PETERSON [25] allein als freies Aldosteron erwies. Mit 25000 E Ketodase pro 50 ml Inkubationslösung mit 5 γ 18-Gluc. wurden im Durchschnitt 11 % des 18-Gluc. gespalten. Dieser Wert stimmt mit den von AYRES u. Mitarb. [20] indirekt gefundenen 12 % und den von PASQUALINI u. Mitarb. [26] angegebenen Zahlen überein.

Das THA-Gluc. wurde bei einer Konzentration von 5 γ in 50 ml Inkubationslösung von 500 E Ketodase/ml zu 95 % und mehr gespalten. Die anschließende Methylenchloridextraktion und Chromatographie im System BMW nach PETERSON [25] ergab als einziges vorhandenes Steroid das freie THA. Nach 24stündiger Inkubation bei pH 1 entsteht praktisch kein freies THA, sondern mit Methylenchlorid extrahierbare Zersetzungsprodukte, die bis zu 10 % der ursprünglich vorhandenen Radioaktivität ausmachen können. Dies stimmt mit Beobachtungen von LUETSCHER u. Mitarb. [27] überein, welche nach vorangegangener pH 1-Hydrolyse im Urin nur noch vermindert freies THA mit Ketodase gewinnen konnten.

Mengenbestimmung und Aufbewahrung

Die Menge der isolierten Substanzen wurde anhand der spezifischen Aktivität bestimmt. Diese ergab sich aus den Mengen radioaktiven Aldosterons und nichtradioaktiven Aldosterons, die der Patient zu trinken bekommen hatte. Daß die spezifische Aktivität des Aldosterons und seiner Metaboliten nach Ausscheidung im Urin praktisch dieselbe bleibt, zeigten bereits ROSENBERG u. Mitarb. [28] und UNDERWOOD und TAIT [15]. Wir bestimmten zur eigenen Kontrolle bei 2 Patienten, die Aldosteron oral erhalten hatten, die Sekretionsrate im 24 Std-Urin, d.h. in unserem Falle die eingenommene Menge Aldosteron,

nach der Methode von KLIMAN und PETERSON [25]. Beide Male stimmten die Werte der Sekretionsrate mit der eingenommenen Menge Aldosteron innerhalb der methodischen Fehlerbreite überein.

Die Radioaktivität wurde mit einem Szintillationszähler (Packard, Model 500 D) bestimmt. In der Regel wurden 0,2 ml der zu zählenden Lösung in 3 ml 96%igem Äthanol und 10 ml Phosphor-Toluollösung gelöst. Innere Quenchkorrektur wurde gleichzeitig durchgeführt.

Die isolierten Substanzen wurden in verschiedener Weise aufbewahrt. THA-Gluc. ist sowohl in absolutem Alkohol wie auch in wäßriger Lösung über Monate haltbar. Es wird auch nur in geringen Mengen an die Glaswand adsorbiert. Das 18-Gluc. dagegen zersetzt sich nach etwa 4–5 Monaten zu einem großen Teil, vor allem in wäßrigen Lösungen. Die Adsorption an die Glaswand ist erheblich und kann innerhalb 1 Woche bis zu 25% Verlust von 18-Gluc. führen. Aus diesen Gründen wurde das 18-Gluc. am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht und im Tiefkühlschrank aufbewahrt und erst kurz vor den einzelnen Versuchen in 50%igem Alkohol gelöst. Vor jedem Versuch wurde die Radioaktivität zur genauen Berechnung der vorhandenen Konzentration bestimmt. Das isolierte 18-Gluc. wurde nach 3–4 Wochen wieder rechromatographiert.

Bestimmung der Ausbeute

Zur Berechnung der Ausbeute unserer Methode bestimmten wir das Metabolitenverhältnis in den ausgeschiedenen Urinportionen [29]. In der Tabelle 2 sind für 3 Urinportionen eines Patienten die Gesamtradioaktivitäten der einzelnen Metaboliten in „counts per minute“ (cpm) und ihre relativen Anteile an der Gesamtradioaktivität angegeben (Metabolitenverhältnis). In der letzten Rubrik sind die Mengen von isoliertem THA-Gluc. und 18-Gluc. und ihre relativen Anteile an der ursprünglich im Urin vorhandenen Menge aufgeführt (Ausbeute). Daraus geht hervor, daß die Ausbeute für das THA-Gluc. etwa 80% und für das 18-Gluc. knapp 50% beträgt.

Zusammenfassung. Zur Isolierung von Tetrahydroaldosteronglucuronid und 18-Aldosteronglucuronid aus menschlichem Urin wird eine Kombination von verschiedenen Methoden angegeben, und die einzelnen Schritte werden diskutiert. Die Ausbeute für das Tetrahydroaldosteronglucuronid beträgt 80% und für das 18-Aldosteronglucuronid knapp 50%.

Summary. 18-aldosterone glucuronide and tetrahydroaldosterone glucuronide were isolated from human urine by ether-ethanol extraction, column chromatography on alumina and paper chromatography with two different solvent systems. The yields were nearly 50% for 18-aldosterone glucuronide and 80% for tetrahydroaldosterone glucuronide.

Literatur. 1. DEMING, Q. B., and J. A. LUETSCHER: Bioassay of DOCA-like material in urine. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **73**, 171 (1950). — 2. LUETSCHER, J. A., and B. B. JOHNSON: Chromatographic separation of the sodium-retaining corticoid from urine of children with nephrosis, compared with observations on normal children. *J. clin. Invest.* **33**, 276 (1954). — 3. SIMPSON, S. A., and J. F. TAIT: Physico-chemical methods of detection of a previously unidentified adrenal hormone. Symposium on the determination of adrenocortical steroids. *Mem. Soc. Endocrinol. (London)* **2**, 9 (1953). —

4. SIMPSON, S. A., J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. VON EUW, O. SCHINDER u. T. REICHSTEIN: Aldosteron. Isolierung und Eigenschaften. Über Bestandteile der Nebennierenrinde und verwandte Stoffe. *Helv. chim. Acta* **37**, 1163 (1954). — 5. LUETSCHER, J. A., R. NEHER, and A. WETTSTEIN: Isolation of crystalline aldosterone from the urine of a nephrotic patient. *Experientia (Basel)* **10**, 456 (1954). — 6. VENNING, E. H., A. CARBALLEIRA, and J. DYRENFURTH: Excretion of sodium-retaining substances. *J. clin. Endocr.* **14**, 784 (1954). — 7. LUETSCHER, J. A., and B. J. AXELRAD: Sodium-retaining corticoid in the urine of normal children and adults and of patients with hypoadrenalism or hypopituitarism. *J. clin. Endocr.* **14**, 1086 (1954). — 8. AXELRAD, B. J., J. E. CATES, B. B. JOHNSON, and J. A. LUETSCHER: Aldosterone in urine of normal man and patients with oedema. *Brit. med. J.* **1955** **1**, 196. — 9. ULICK, S., K. KUSCH, and J. T. AUGUST: Correction of the structure of a urinary metabolite of aldosterone. *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 4482 (1961). — 10. ULICK, S., and S. LIEBERMAN: Evidence for the occurrence of a metabolite of aldosterone in urine. *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 6567 (1957). — 11. KELLY, W. G., and S. LIEBERMAN: Isolation and characterization of human urinary metabolites of aldosterone, p. 103. Oxford: Blackwell Sci. Publ. 1964. — 12. SIEGENTHALER, W., M. MANN, J. GFELLER u. A. GANZONI: Aldosteronforschung und klinische Medizin. *Schweiz. med. Wschr.* **94**, 685 (1964). — 13. AYRES, P. J., O. GARROD, S. A. S. TAIT, J. F. TAIT, and G. WALKER: The use of (16-³H)aldosterone in studies on human peripheral blood. *CIBA Found. Coll.* **11**, 309 (1957). — 14. BOUGAS, J., C. FLOOD, B. LITTLE, J. F. TAIT, S. A. S. TAIT, and R. UNDERWOOD: Dynamic aspects of aldosterone metabolism, p. 25. Oxford: Blackwell Sci. Publ. 1964. — 15. UNDERWOOD, R. H., and J. F. TAIT: Purification, partial characterization and metabolism of an acid labile conjugate of aldosterone. *J. clin. Endocr.* **24**, 1110 (1964). — 16. PASQUALINI, J. R.: Aldosterone and tetrahydroaldosterone conjugation in human urine and plasma, p. 131. Oxford: Blackwell Sci. Publ. 1964. — 17. EDWARDS, R. W. H., A. E. KELLIE, and A. P. WADE: The extraction and oxidation of urinary steroid conjugates. *Mem. Soc. Endocrinol. (London)* **2**, 53 (1953). — 18. BARLOW, J. J.: Some observations on the behavior of steroid conjugates on alumina. *Biochem. J.* **50**, 370 (1957). — 19. FLOOD, C., D. S. LAYNE, S. RAMCHERAN, E. ROSSIPAL, J. F. TAIT, and S. A. S. TAIT: An investigation of the urinary metabolites and secretion rates of aldosterone and cortisol in man and a description of methods for their measurement. *Acta endocr.* **36**, 237 (1961). — 20. AYRES, P. J., J. BARLOW, O. GARROD, A. E. KELLIE, S. A. S. TAIT, J. F. TAIT, and G. WALKER: The metabolism of 16-³H-aldosterone in man, p. 73. London: Churchill Ltd. 1958. — 21. TAIT J. F., and S. A. S. TAIT: Assay of aldosterone and metabolites. *Methods in hormone research*, vol. 1, p. 265. New York: Academic Press 1962. — 22. ELLIOTT, T. H., D. V. PARKE, and R. T. WILLIAMS: Metabolism of cyclohexan. *Biochem. J.* **72**, 193 (1959). — 23. SCHNEIDER, J. J., and M. J. LEWBART: Paper chromatography of steroid glucuronides and sulfates. *J. biol. Chem.* **222**, 787 (1956). — 24. HAINES, C. S., and F. A. ISHERWOOD: Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. *Nature (Lond.)* **164**, 1107 (1949). — 25. KLIMAN, B., and R. E. PETERSON: Double isotope derivative assay of aldosterone in biological extracts. *J. biol. Chem.* **235**, 1639 (1960). — 26. PASQUALINI, J. R., F. UHRICH, and M. F. JAYLE: Contribution to the study of the structure of the aldosterone-conjugate isolated from urine. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **104**, 515 (1965). — 27. LUETSCHER, J. A., E. W. HANCOCK, C. A. CAMARGO, A. J. DOWDY, and G. W. NOKES: Conjugation of 1,2-³H-aldosterone in human liver and kidneys and renal extraction of aldosterone and labeled conjugates from blood plasma. *J. clin. Endocr.* **25**, 628 (1965). — 28. ROSEMBERG, E. M., E. DENANY, R. BUDNITZ, R. H. UNDERWOOD, and R. S. LEARD: Effects of administration of large amounts of d-aldosterone in normal subjects and in a patient with Sheehan's syndrome. *J. clin. Endocr.* **22**, 465 (1962). — 29. MÖHRING, J., B. MÖHRING u. W. SIEGENTHALER: Zum extrahepatischen Stoffwechsel von Aldosteron. III. Bildung und Ausscheidung von 18-Aldosteronglucuronid in den Nieren des Menschen. *Z. ges. exp. Med. (im Druck)* (1968).

Dr. J. MÖHRING
Kantonsspital Zürich
Med. Universitäts-Poliklinik
CH-8006 Zürich (Schweiz)
Rämistr. 100

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg

Curriculum vitae

Am 20. 4. 1940 wurde ich als zweites Kind des EMIL MÖHRING und seiner Ehefrau GERDA, geb. BRANDAU, in Berlin geboren. Ich besuchte $3\frac{1}{2}$ Jahre lang die Grundschule zunächst in Bischofferode/Krs. Melsungen und zuletzt in Frankfurt/Main. Neun Jahre lang war ich Schüler des Goethe-Gymnasiums in Frankfurt/Main, wo ich im Frühjahr 1959 meine Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1959 begann ich in Frankfurt/Main mit dem Studium der Medizin, das ich in Zürich fortsetzte und im Juli 1965 in Tübingen mit dem Staatsexamen abschloß. Seit Oktober 1965 habe ich als wissenschaftlicher Assistent von Prof. W. SIEGENTHALER an der medizinischen Poliklinik der Universität Zürich gearbeitet.

